

측두엽간질에서 해마경화에 따른 칼슘결합단백 발현 및 치상회 태상섬유의 시냅스 재구성

계명대학교 의과대학 병리학교실 및 의과학연구소

김상표 · 김승필 · 조승제 · 조영록 · 전지민 · 강유나 · 권건영 · 장은숙

Synaptic Reorganization of Dentate Mossy Fibers and Expression of Calcium Binding Proteins in Hippocampal Sclerosis of Temporal Lobe Epilepsy

Sang Pyo Kim, Seung Pil Kim, Seung Che Cho, Young Rok Cho, Ji Min Jeon,
Yu Na Kang, Kun Young Kwon, and Eun Sook Chang

Department of Pathology and Institute for Medical Science,
Keimyung University School of Medicine, Taegu 700-712, Korea

This study was designed to identify expression of calcium-binding proteins and synaptic reorganizations of dentate mossy fibers in hippocampal sclerosis of human temporal lobe epilepsy. Hippocampal neuronal density was quantitatively analyzed in temporal lobe epilepsy group (n=50) to investigate the degree of hippocampal sclerosis and it was compared with that of autopsy control (n=3). To verify the distribution of calcium-binding proteins in neurons of epileptic hippocampi, the parvalbumin (PV)-immunoreactive and calbindin-D28K (CB)-immunoreactive neurons were quantitatively analyzed in each area of Ammon's horn by immunohistochemical stain. Also, to clarify synaptic reorganizations of the dentate mossy fibers, a part of each hippocampus was examined under light microscopy and transmission electron microscopy using Timm sulphide silver method. In epileptic hippocampi, severity of hippocampal sclerosis (HS) was graded four, which consisted of 3 cases with no HS, 6 mild HS, 12 moderate HS, and 29 severe HS. The hippocampal neuronal loss was most prominent in CA1, followed by CA4 and CA2. Expression of calcium-binding proteins was more prevalent in CA2 of all groups. The proportion of PV-immunoreactive neurons in CA1 and CA4 significantly increased in the moderate and severe HS group, whereas the proportion of CB-immunoreactive neurons did not correlated with the severity of HS. Timm granules were noted in inner molecular supragranular layer of dentate gyrus of epileptic hippocampi and they tended to increase in proportion along with the severity of hippocampal sclerosis. Transmission electron microscopy showed that supragranular Timm granules corresponded to synaptic terminals of mossy fibers. These results suggest that parvalbumin appears to have more protective effect against neuronal loss and that mossy fiber synaptic reorganization seems to play a major role in pathogenesis of hippocampal sclerosis of human temporal lobe epilepsy. (Korean J Pathol 1998; 32: 328~336)

Key Words: Temporal lobe epilepsy, Hippocampal sclerosis, Calcium-binding protein, Timm granule, Mossy fiber synaptic reorganization

접 수: 1997년 11월 22일, 게재승인: 1998년 3월 23일

주 소: 대구광역시 중구 동산동 194번지, 우편번호 700-712, 계명대학교 의과대학 병리학교실, 김상표

ISSN : 0379-1149

*이 논문은 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었음.

서 론

간질을 포함하는 만성신경계질환들에 대한 연구들은 뇌신경세포 배양 및 각 질환에 대한 동물모델 등을 이용하여 분자생물학적, 약물학적 및 전기생리학적 기법 등을 응용한 연구들이 근간을 이루고 있으며 간질환자의 뇌조직을 이용하여 형태학적으로 병리기전을 규명한 연구들은 극히 제한되어 있는 실정이다. 따라서 사람의 뇌조직을 이용하여 간질 기전을 연구할 필요성이 대두되고 있으며 가장 효율적인 방법은 최근에 많이 시행되고 있는 측두엽간질환자에서 수술시 제거된 뇌조직을 이용하는 것이다.

간질 분야의 연구에서 가장 중요한 역할을 담당하는 세포는 대뇌피질 세포들의 약 70%를 담당하는 추체세포들이다. 추체세포들은 기억, 학습 및 기타 타 부위와의 연합기능등을 주관하고 있으며 또한 추체세포들의 수상돌기들과 축삭들은 대뇌반구내에서 연결섬유와 양뇌 반구간을 잇는 뇌량섬유 및 뇌피질 영역을 연결하는 피질원심성섬유와 같은 신경경로를 이루면서 사실상 시냅스를 형성하고 있다.¹ 이미 알려진 간질의 기전들은 흥분성 신경전도물질인 glutamate 등과 반응하는 글루탐산성 신경세포의 과잉방전 때문이며, 이 흥분상태는 주로 GABA성 중간신경세포들의 억제입력들에 의하여 흥분과 억제의 균형을 이루고 있던 상태가 무슨 이유로서인지 파괴됨으로써 발생되며 그 결과 반복적인 발작이 일어난다고 보고되고 있다.^{2,3} 특히 과잉방전 과정에서 칼슘을 중심으로 한 신호전달계가 관여하고 있는 것은 이미 정설로 되어 있고 칼슘의 유입에 의한 신경세포의 손상 정도는 주로 parvalbumin과 calbindin-D28K 같은 칼슘결합단백이 신경세포내에 존재하는 양과 관련이 있는 것으로 생각하고 있다.⁴ 한편 측두엽간질에서는 일차적인 병변에 의해서 간질발작이 지속적으로 유발되면 변연계의 신경전달체계를 통하여 해마의 암몬각과 편도체의 신경세포들이 지속적인 흥분을 받게되어 내측두엽 경화증 (mesial temporal sclerosis) 이 발생되고 이것이 간질발작을 더욱 촉진시키는데 기여한다는 설이 있으나 측두엽간질의 기전을 분명하게 모두 설명할 수 있는 정설은 없는 형편이다.⁵ 일반적으로 해마의 치상회 (dentate fascia)는 대뇌피질로부터 관통성 경로 (perforant pathway)를 통해 뇌의 광범위한 부위로부터 입력을 받으며 치상회의 과립세포들은 신경세포의 흥분과 억제상태를 균등하게 유지시키는 것으로 알려져 있다.⁶ 측두엽간질에서 가장 흔히 관찰되는 병리조직학적 병변은 내측두엽 경화증이며,^{7,8} 이 때에 신경세포 소실에 의한 암몬각 경화 (Ammon's horn sclerosis)와 치상회의 과립세포 소실 및 분산 등이 관찰된다.⁹ 그러나 해마 및 편도체 경화를 포함하는 내측두엽 경화증은 최종적으로 나타나는 형태학적인 변화일 뿐 간질기전의 규명에 일조할 것으로 판단되는 신경세포의 수상돌기 및 축삭들의 분포 및 변화는 단순한 조

직학적 관찰만으로는 알 수가 없다. 이중 치상회 과립세포의 축삭인 태상섬유 (mossy fibers)의 발아에 의한 시냅스 재구성 등의 소견¹⁰⁻¹⁴이 측두엽간질 기전 중의 하나로 보고되고 있다. 최근에 측두엽간질 동물모델 및 환자의 해마에서 Timm sulphide silver 조직화학기법¹⁵⁻¹⁷을 이용하여 태상섬유의 시냅스 재구성 양상을 조사하고 이와 더불어 초미세형태학적으로 Timm sulphide silver 기법을 적용하여 태상섬유의 시냅스 재구성 부위를 확인함으로써 측두엽간질의 기전을 규명하려는 시도들이 있으며 해마경화시에 흔히 관찰이 되는 암몬각과 치상회의 신경세포 소실은 parvalbumin 및 calbindin-D28K와 같은 칼슘결합단백들이 소량 분포하는 신경세포일수록 변성 및 소실이 현저하게 나타난다는 사실이 보고되고 있다.¹⁸ 이에 본 연구자들은 측두엽간질 수술시 제거된 해마조직을 사용하여 암몬각 신경세포들의 경화정도를 파악한 후 Timm sulphide silver 조직화학기법 및 본 기법을 이용한 전자현미경적 검색을 실시하여 태상섬유의 변화양상과 초미세형태학적 변화를 규명하고자 하였으며, 또한 측두엽간질의 해마 암몬각에서 칼슘결합단백들인 parvalbumin과 calbindin-D28K에 대한 단클론 항체를 이용한 면역조직화학적 방법을 시행한 후 그 발현의 분포를 파악하여 측두엽간질에서 해마경화증의 발생기전을 형태학적으로 밝히고자 본 연구를 시행하였다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

계명대학교 동산의료원에서 최근 5년 동안 측두엽절제술에 의해 제거된 측두엽간질환자의 해마조직 중 CA1, CA2, CA4 및 치상회가 잘 보존되어 있는 50예를 선택하였다. 대조군은 간질의 병력 혹은 신경계 질환없이 부검된 뇌의 해마조직 3예를 사용하였다. 대조군은 21, 23 및 24세된 남자에서 부검시에 얻어진 해마조직으로 각각 교통사고사, 의사 및 원발성 쇼크사로 사망하였으며 사인외에 동반된 질병은 관찰할 수 없었다.

2. 병리조직학적 검색

1) 광학현미경적 관찰: 먼저 적출된 해마조직을 hematoxylin-eosin염색을 실시하여 암몬각의 CA1, CA2 및 CA4의 신경세포 수와 치상회 과립세포의 수를 조사하였으며 CA3영역의 신경세포 수는 전해마절제술에 의해서 조직학적으로 확인하기 어려운 예들이 많아 제외하였다. 해마 신경세포의 수는 대표되는 해마절편의 CA1, CA2 및 CA4와 치상회 과립세포를 현미경 ×200배 시야에서 관찰한 후 각 영역의 신경세포 수를 세어 계산하였다. 신경세포의 소실정도는 Levesque등¹⁹의 기준을 참조로 하여 경도, 중등도 및 고도로 구분하였고 경도는 대조군에 비하여 30% 미만의 소실이 있는 경우, 중등도는 30~80%의 소실이 있는 경우, 고도는

80% 이상의 소실이 있는 경우로 하였으며 이때의 신경세포 소실율은 측두엽간질에서 가장 많은 신경세포의 소실을 보이는 부위인 CA1과 CA4의 신경세포 수를 대조군의 신경세포의 수와 비교한 후 평균 소실정도를 백분율로 산정하였다.

2) Parvalbumin과 Calbindin-D28K에 대한 면역조직화학적 관찰: Parvalbumin과 calbindin-D28K의 발현을 보기 위한 면역조직화학적 염색을 위해 일차항체로 parvalbumin (monoclonal antibody, Sigma, USA) 및 calbindin-D28K (monoclonal antibody, Sigma, USA)을 각각 1:500 및 1:100으로 희석하여 사용하였다. 대표되는 조직절편을 탈파라핀과 탈수를 시행한 후 계열 에탄올을 거쳐 합수하고 메탄올과 30% H₂O₂를 9:1로 혼합한 용액에 30분간 실온에서 방치한 후 0.01 M citrate buffer (pH 6.0)용액에 담근 뒤 microwave로 5분씩 2회 가열하였다. 그 후 1% 정상 마혈청 (normal horse serum, Vectastain kit, USA)으로 37°C에서 30분간 둔 후 30 µl의 일차 항체를 조직절편 위에 놓고 coverslip를 덮은 다음 37°C에서 2시간 두었다. 세척 후 이차 항체 (biotinylated anti-mouse immunoglobulin, Vectastain Elite kit, USA)와 avidin-biotin peroxidase complex (Vector, USA)을 1:200으로 조직절편 위에 적당량 놓은 후 각각 37°C에서 30분간 두었다. 세척은 phosphate-buffered saline (PBS)을 사용하였다. Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)-H₂O₂용액으로 발색하고 Meyer's hematoxylin으로 대조 염색 후에 관찰하였다. Parvalbumin과 calbindin-D28K에 대한 면역조직화학적 염색의 결과 판정은 해마절편의 CA1, CA2과 CA4 및 치상회 과립세포를 현미경 ×200배 시야에서 관찰한 후 면역반응을 보이는 신경세포의 수를 각 영역별로 센 다음 그 평균을 내어 각군에 해당하는 평균 신경세포 수와 비교하여 백분율로 계산하였다.

3) Timm sulphide silver 조직화학 염색을 이용한 광학현미경적 관찰: Timm sulphide silver 조직화학염색은 정상대조군 3예와 해마경화가 없는 군 3예 및 해마경화군 13예의 해마조직을 사용하였다. 해마경화군 13예는 경도의 신경세포 소실을 보인 2예에서 각각 16%와 25%의 소실률을 보였고, 중등도의 신경세포소실을 보인 8예는 각각 52, 59, 61, 67, 69, 73, 75 및 78%의 소실률을 나타내었으며, 고도의 신경세포 소실을 보인 예에서는 81, 88 및 93%의 소실률을 보였다. 적출된 해마조직은 3.0 mm 두께의 조직절편을 만들어 0.4% sodium sulfide용액에 약 20분정도 담근 후 -4°C의 1% paraformaldehyde와 1.25% glutaraldehyde의 혼합용액에 하룻 밤 고정시켰다. 고정 후 즉시 조직을 냉동시킨 다음 10 µm 두께로 조직편을 만들어 유리슬라이드에 부착시킨 후 0.5% gelatin으로 coating시켜 Danscher방법¹⁶으로 현상한 다음 광학현미경으로 관찰하여 해마의 암몬각 신경세포 소실에 따른 치상회 상부과립층의 내분자층에 Timm과립들의 변화양상을 검색하였다. 해마조

직의 시냅스 재구성을 확인할 수 있는 아연을 가시화하기 위해 사용한 현상액은 20% gum arabic용액, 5.6% hydroquinone, citrate 완충액을 각각 12:6:2의 비율로 섞어서 사용하였다. 결과판정은 정상대조군과 비교하여 형태학적으로 해마경화군의 과립상부층에서 Timm 과립의 존재 및 증가가 관찰되는지를 확인하였다.

4) Timm sulphide silver 기법을 이용한 투과전자현미경적 관찰: Timm sulphide silver 기법을 이용한 투과전자현미경적 관찰은 대조군 해마조직 2예와 측두엽간질군 해마 5예에서 시행하였다. 우선 해마를 1.0 mm 두께의 조직절편을 만들어 실온에서 0.4% sodium sulfide용액에 약 20분 정도 담근 후 -4°C의 1% paraformaldehyde와 1.25% glutaraldehyde의 혼합용액에 하룻 밤 고정시킨 다음 0.15 M sodium phosphate buffer로 세척한 다음 계열 에탄올로 탈수하였다. Propylene oxide로 치환한 후 Luft방법²⁰에 의한 epon 혼합물로 포매하여 45°C 이하에서 48~72시간 동안 열중합 시켰다. 0.5% gelatin으로 coating된 slide에 1 µm 두께로 후박절 (semithin)한 절편을 올리고 건조시킨 다음 다시 gelatin으로 coating시켜 Danscher 방법¹⁶으로 현상한 다음 치상회 상부과립층의 분자층부위를 선택한 후 초박절편을 얻어서 nickel grid에 부착하였다. 투과전자현미경적 관찰시 이미 시료 내에 존재하는 아연을 가시화하기 위해 사용한 현상액은 gum arabic 용액, citrate 완충액, 환원제 및 은용액을 각각 60:10:15:15의 비율로 섞어서 사용하였다. 시료가 부착된 grid를 현상액 속에 침수시킨 후 암실에서 26°C에 1시간 동안 방치하였다. Gum arabic 용액은 crystalline gum arabic 1 kg을 2 L의 증류수에 녹여 5일간 방치한 후 거르기로 걸러서 사용하며, citrate 완충액은 25.5 g의 citrate acid와 23.5 g의 sodium citrate를 100 ml의 증류수에 섞어서 사용하였다. 환원제로는 0.85 g의 hydroquinone을 15 ml의 증류수에 섞어서 사용하며, 은용액은 0.11 g의 silver lactate를 15 ml의 증류수에 섞어서 사용하였다. 은용액은 현상직전에 나머지 용액들과 섞어서 사용하고 암실에서 26°C를 유지하면서 1시간 동안 방치한 후 증류수에 충분히 세척한 후 uranyl acetate와 lead citrate로 이중전자염색을 실시하여 Hitachi H-7200 투과전자현미경으로 관찰하였다. Timm sulphide silver 기법을 이용한 투과전자현미경적 관찰의 주된 부위는 치상회 과립상부층의 내분자층이며 이 부위에서 시냅스 재구성이 된 부위에 초미형태학적으로 Timm 과립이 증가되어 있는지를 확인하였다.

5) 통계학적인 분석: 암몬각 CA1, CA2, CA4 영역 및 치상회 과립세포의 신경세포 수에 대한 측정 결과는 Wilcoxon의 부호순위 방법을 이용하여 평균차이의 유의성을 검정하였으며 칼슘결합단백에 발현을 보이는 신경세포 수의 비율은 Wilcoxon의 부호순위 방법을 이용하여 대조군에 비하여 칼슘결합단백에 발현을 보이는 신경세포의 비율이 유의하게 증가하는지를 검정하

였다.

결 과

1. 임상적 소견

검색대상 50명중 32예가 남자, 18예가 여자였으며, 연령은 13세에서 42세의 분포를 보이면서 평균 26.9세였다. 간질의 병력은 3~31년간이었으며 항경련제에 반응하지 않았다 (Table 1).

2. 광학현미경적 소견

대조군 3예의 해마조직은 암몬각 CA1, 2 및 CA4의 신경세포들이 소실 없이 잘 유지되어 있었으며 치상회 과립세포들의 분산 및 소실은 관찰할 수 없었다 (Fig. 1a, 2a, 3a). 대조군의 신경세포의 수는 평균 CA1 77.0 ± 2.6개, CA2 57.7 ± 3.1개, CA4 67.7 ± 12.3개 및 치상회 290.3 ± 20.4개로서 총 492.7 ± 18.5개였다. 측두엽간질 해마 50예에서 대한 분석결과 3예를 제외한 47예에서 해마경화가 관찰되었다. 47예의 해마경화군의 신경세포 소실정도는 경도가 6예로서 평균 374.2 ± 13.1개 (이하 평균 소실률 25.3%, 범위 16.1~27.4%)의 신경세포가 관찰되었으며, 중등도가 12예로서 평균 252.5 ± 23.3개 (68.7%, 범위 52.3-79.3%) 및 고도가 29예로서 평균 133.7 ± 11.6개 (87%, 범위 81.3-94.5%)가 관찰되

었다 (Table 2). 각 영역별 신경세포의 소실 정도는 CA1 영역의 신경세포 수가 대조군에 비해 중등도 및 고도 소실군에서 각각 평균 14.1 ± 0.8개 (81.7%)와 CA1 6.4 ± 3.4개 (91.7%)로 유의성있게 감소되었다 (Fig. 1d). CA2 영역에서는 대조군에 비해 경도, 중등도 및 고도 소실군에서 약간 감소하는 경향을 보였으나 통계학적으로 유의성 있는 감소는 없었고 (Fig. 2d), CA4 영역에서는 대조군에 비해 중등도 및 고도 소실군에서 각각 평균 30.2 ± 13.6개 (55.7%)와 12.3 ± 4.7개 (81.8%)로서 유의하게 감소하는 경향을 보였다 (Table 2, Fig. 3d). 치상회 과립세포는 대조군에 비해 경도, 중등도 및 고도 소실군에서 각각 213.1 ± 17.2개 (26.6%)와 166.6 ± 25.9개 (42.6%) 및 75.5 ± 12.4개 (74%)로서 해마암몬각의 신경세포의 소실이 있는 모든 예에서 유의하게 감소되었다.

3. Parvalbumin과 Calbindin-D28K에 대한 면역조직화학적 검색

Parvalbumin에 대한 면역조직화학 염색 결과 대조군의 CA1에서 발현되는 신경세포의 비율은 평균 2.9% (이하 평균 신경세포수 2.3 ± 0.6개)이며 (Fig. 1b), CA2에서는 67% (38.7 ± 12.1개) (Fig. 2b), CA4에서는 2.5% (1.7 ± 0.6개)였다 (Fig. 3b). Parvalbumin 양성 신경세포의 비율은 대조군 및 해마경화군에서 공히 CA1과 CA4에 비해 CA2영역에서 현저히 많은 발현율을 보였다. CA1과 CA4에서 parvalbumin 양성 신경세포의 비율이 대조군에 비해 중등도 및 고도의 해마경화군에서 통계학적으로 유의하게 증가하는 경향을 보였으나 CA2에서는 parvalbumin 양성 신경세포 비율이 해마경화와 통계적으로 유의한 관계가 없었다 (Table 3, Fig. 1e, 2e, 3e). 치상회 과립세포에서는 parvalbumin에 대한 발현이 대조군 및 해마경화군 모두에서 보이지 않았으며 해마 지각 (subiculum)의 신경세포들은 강한 발현을 보이는 세포에서부터 약한 발현을 보이는 세포까지 다양하게 관찰되었다. Calbindin-D28K에 대한 면역조직화학 염색 결과 대조군에서는 calbindin-D28K 양성 신경세포의 비

Table 1. Age and sex distribution

Age(years)	Male	Female	Total(%)
13~19	6	2	8(16%)
20~29	12	9	21(42%)
30~39	12	6	18(36%)
40~42	2	1	3(6%)
Total	32	18	50(100%)

Table 2. Hippocampal neuronal density in the control and temporal lobe epilepsy cases

	Control (n=3)	No HS (n=3)	Mild HS (n=6)	Moderate HS (n=12)	Severe HS (n=29)
CA1	77.0 ± 2.6	78.2 ± 3.2	67.3 ± 5.7	14.1 ± 0.8*	6.4 ± 3.4*
CA2	57.7 ± 3.1	54.9 ± 4.6	51.8 ± 11.5	41.6 ± 13.2	39.5 ± 10.8
CA4	67.7 ± 12.3	66.1 ± 8.8	42.0 ± 8.9*	30.2 ± 13.6*	12.3 ± 4.7*
DF	290.3 ± 20.4	278.0 ± 31.1	213.1 ± 17.2*	166.6 ± 25.9*	75.5 ± 12.4*
Total	492.7 ± 18.5	477.2 ± 26.4	374.2 ± 13.1*	252.5 ± 23.3*	133.7 ± 11.6*

Values represent mean ± SD. *P < 0.05, compared with control group. HS: hippocampal sclerosis, CA: cornu ammonis, DF: dentate fascia.

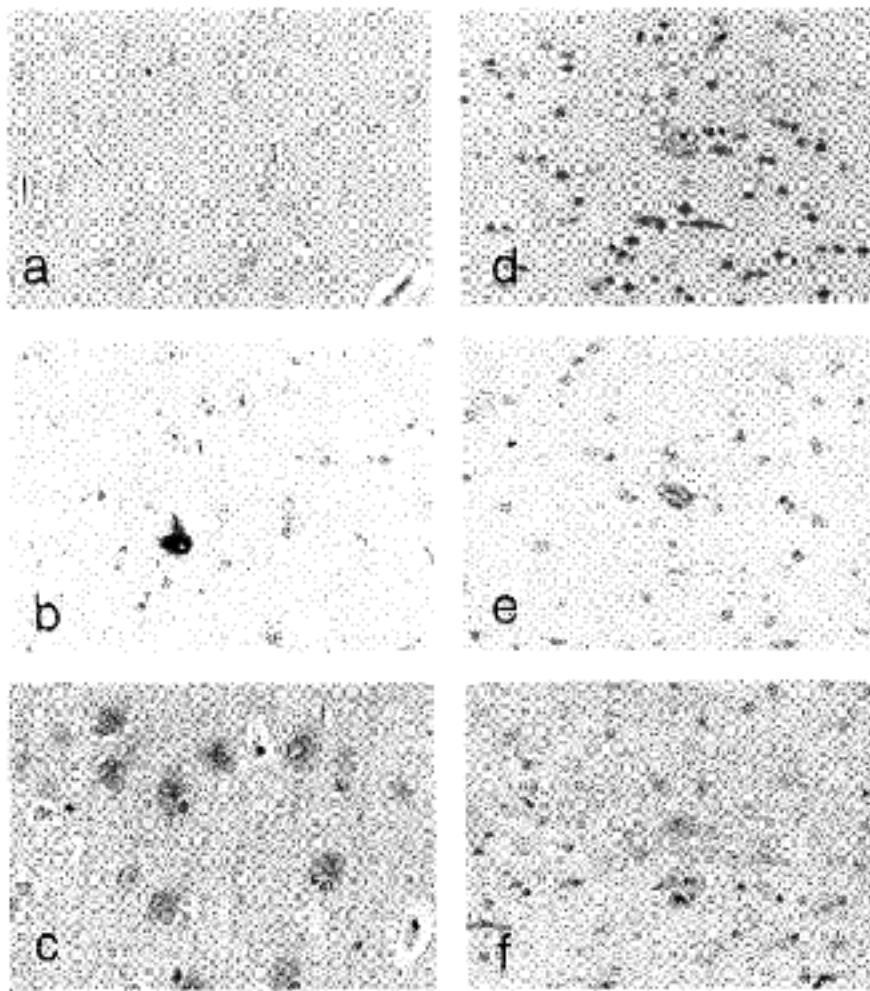


Fig. 1. CA1 neurons of control (a-c) and hippocampal sclerosis group (d-f). a: Well preserved CA1 neurons. b, e: Parvalbumin-immunoreactive neurons are very rarely observed. c: Calbindin-D28K-immunoreactive neurons are frequently found. d: Marked neuronal loss in the severe hippocampal sclerosis group. f: A few calbindin-D28K-immunoreactive neurons are noted.

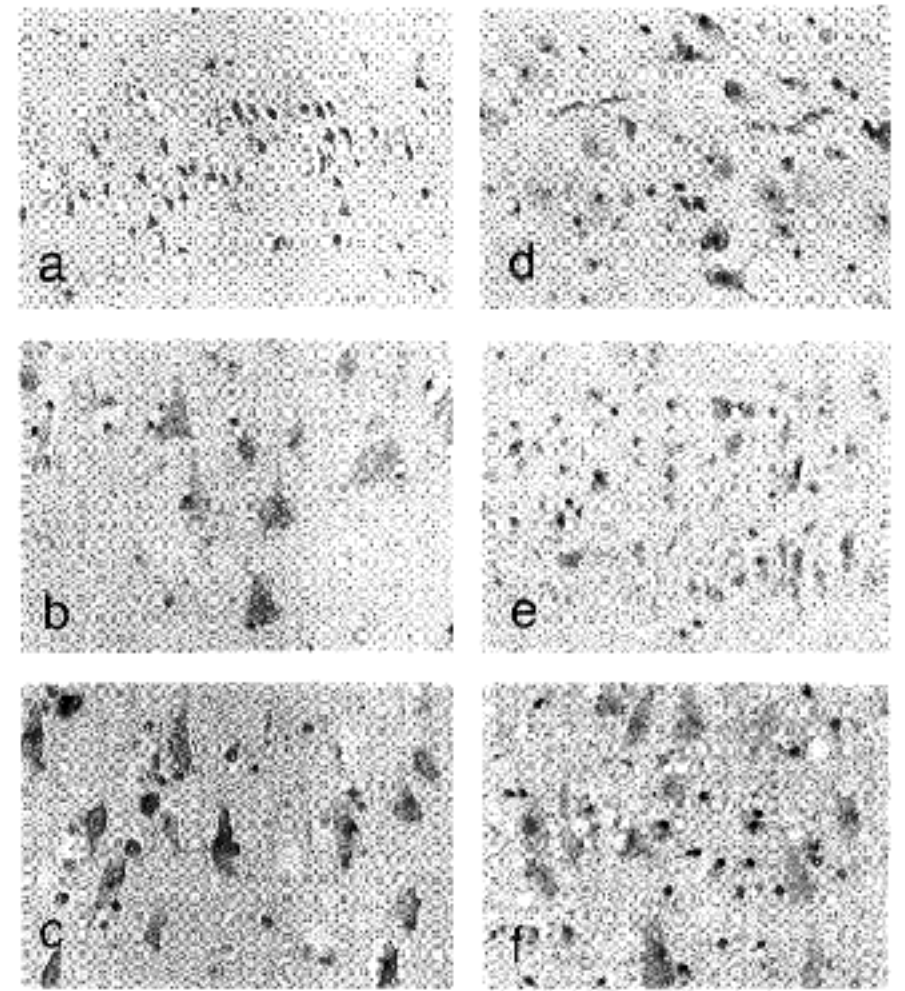


Fig. 2. CA2 neurons of control (a-c) and hippocampal sclerosis group (d-f). a: Well preserved CA2 neurons show pyknotic nuclei. b, c: Most of CA2 neurons reveal parvalbumin (b) and calbindin-D28K (c) immunoreactivity. d: Mild CA2 neuronal loss is found in the severe hippocampal sclerosis group. e, f: Most of CA2 neurons show strong immunoreactivity for parvalbumin (e) and calbindin-D28K (f).

Table 3. Ratio of parvalbumin-immunoreactive neurons to hippocampal neuronal density in the control and temporal lobe epilepsy cases

	Control	No HS (PA-ir neurons/hippocampal neuronal density (%))	Mild HS	Moderate HS	Severe HS
CA1	2.3/77(2.9%)	2.8/78.2(3.6%)	5.3/67.3(7.9%)	3.9/14.1(2.8%)	1.3/6.4(20.3%*)
CA2	38.7/57.7(67%)	39.9/54.9(72.7%)	33.8/51.8(65.3%)	26.6/41.6(63.9%)	27.2/39.5(68.9%)
CA4	1.7/67.7(2.5%)	1.5/66.1(2.3%)	1.3/42.0(3.1%)	2.8/30.2(9.3%*)	0.6/12.3(4.9%*)
DF	0/290.3(0%)	0/278(0%)	0/213.1(0%)	0/166.6(0%)	0/75.5(0%)
Total	42.7/492.7(8.7%)	44.2/477.2(9.3%)	40.4/374.2(10.1%)	33.3/252.5(13.2%)	29.1/133.7(21.8%*)

Values represent mean. *P < 0.05, compared with control group. HS: hippocampal sclerosis, PA-ir: parvalbumin immunoreactive, CA: cornu ammonis, DF: dentate fascia.

율은 CA1에는 평균 74% (57.0 ± 3.7개) (Fig. 1c), CA2 83.7% (48.3 ± 12.9개) (Fig. 2c), CA4 88.9% (60.2 ± 4.7개) (Fig. 3c) 및 치상회 과립세포에서는 91.4% (265.2 ± 24.8개)였다. 해마경화에 따른 CA1, CA2, CA4 (Table 4, Fig. 1f, 2f, 3f) 및 치상회 과립세포의 calbindin-D28K 양성 신경세포의 비율은 대조군에 비해

유의한 변화는 관찰할 수 없었다.

4. Timm sulphide silver 조직화학 염색 기법을 이용한 광학현미경적 검색

대조군에서는 치상회 과립세포 및 과립상부층 (supragranular layer)의 분자층 (molecular layer)에서는

Table 4. Ratio of calbindin-D28K immunoreactive neurons to hippocampal neuronal density in the control and temporal lobe epilepsy cases

	Control	No HS (CB-ir neurons/hippocampal neuronal density (%))	Mild HS	Moderate HS	Severe HS
CA1	57/77(74%)	55.3/78.2(70.7%)	53.5/67.3(79.5%)	10.6/14.1(75.2%)	5.1/6.4(79.7%)
CA2	48.3/57.7(83.7%)	44.7/54.9(81.4%)	42.4/51.8(81.9%)	36.8/41.6(88.5%)	32.4/39.5(82%)
CA4	60.2/67.7(88.9%)	62.1/66.1(93.9%)	38.0/42.0(90.5%)	27.1/30.2(89.7%)	10.3/12.3(83.7%)
DF	265.2/290.3(91.4%)	259.7/278(93.4%)	198.3/213.1(93.1%)	151/166.6(90.6%)	72.6/75.5(96.2%)
Total	430.7/492.7(87.4%)	421.8/477.2(88.4%)	332.2/374.2(88.8%)	225.5/252.5(89.3%)	120.4/133.7(90.1%)

Values represent mean. *P < 0.05, compared with control group. HS: hippocampal sclerosis, CB-ir: calbindin-D28K immunoreactive, CA: cornu ammonis, DF: dentate fascia.

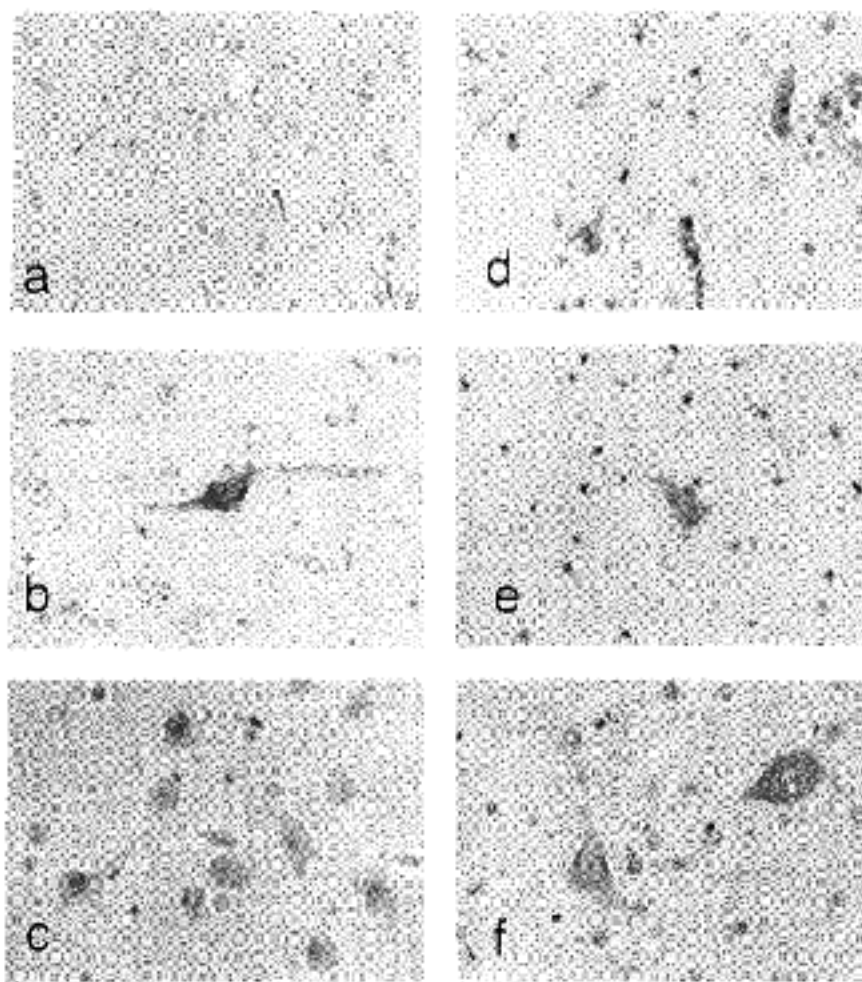


Fig. 3. CA4 neurons of control (a-c) and hippocampal sclerosis group (d-f). a: There are many hilar neurons. b, e: A few hilar neurons show parvalbumin-immunoreactivity. c: Most of hilar neurons show calbindin-D28K immunoreactivity. d: Marked neuronal loss in the severe hippocampal sclerosis group. f: There is a few calbindin-D28K immunoreactive neurons.

Timm 과립을 관찰할 수 없었으며 치상회의 문 (hilum) 부위에서 많은 Timm 과립을 볼 수 있었다 (Fig. 4a). 해마경화를 동반하고 있는 예에서는 치상회 과립세포와 과립상부층의 내분자층 (inner molecular layer)에서 Timm 과립의 존재를 확인하였고 일반적으로 해마경화의 정도가 경도보다는 고도의 예에서 과립상부층의 내

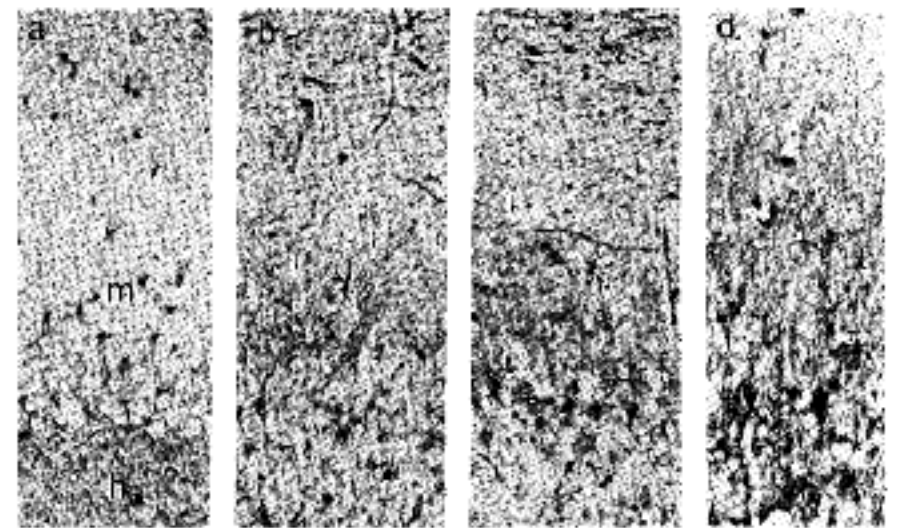


Fig. 4. Control group (a) shows Timm granules only in hilus (b) but not in molecular layer (m). Timm granules (arrows) within the inner molecular layer of dentate fascia tended to increase in proportion along with the severity of hippocampal sclerosis. Percent of hippocampal sclerosis (b: 16%, c: 67%, d: 88%).

분자층에 더욱 더 많은 Timm 과립의 증가를 관찰할 수 있었다 (Fig. 4b, 4c, 4d). 측두엽간질군 중에서 해마경화를 보이지 않았던 3예중에서 1예에서 치상회 과립상부층의 내분자층에 소량의 Timm 과립이 증가한 소견을 관찰할 수 있었다.

5. Timm sulphide silver 기법을 이용한 투과전자 현미경적 검색

내조군의 해마조직 치상회 과립상부층의 내분자층에서는 Timm 과립을 관찰할 수 없었으며 측두엽간질군의 해마조직 5예 중 3예에서 치상회 과립상부층 내분자층의 시냅스 재구성 부위에 Timm 과립들을 관찰할 수 있었다 (Fig. 5).

고 찰

측두엽 간질에서 가장 흔한 병변은 내측두엽 경화증

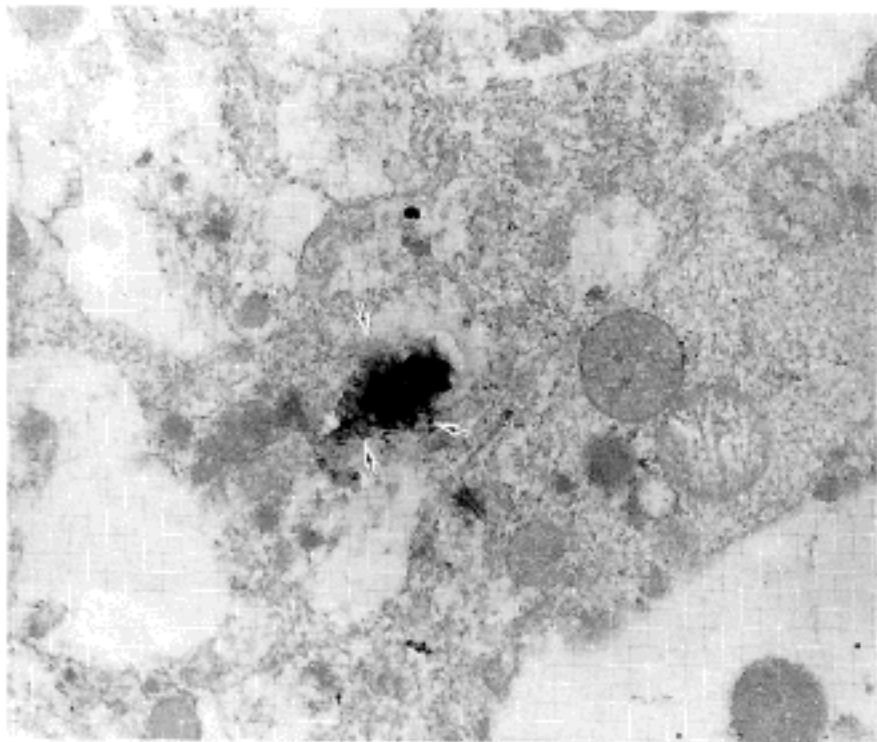


Fig. 5. Timm electron microscopic findings of inner molecular layer of epileptic dentate fascia. Timm reaction products (arrows) located at mossy fiber synaptic terminals (Timm EM, original magnification $\times 12,000$).

(mesial temporal sclerosis)이며 암몬각 CA1 영역에서 가장 많은 신경세포의 소실을 나타내는 것은 이미 널리 알려져 있다.^{7,8,21} 우리나라에서도 김등⁷이 보고한 64세의 측두엽간질의 해마조직을 분석한 결과에 따르면 CA1, CA4, CA3, CA2 영역순으로 신경세포 소실이 진행된다는 점을 지적하였다. 본 연구결과에서도 해마경화가 동반된 47예 중에서 고도의 해마경화를 보인 예가 29예로서 가장 많은 빈도를 차지하였으며 CA1과 CA4의 신경세포 소실률이 CA2에 비해 월등히 높아 심한 경화를 보이는 부위인 것을 확인할 수 있었다. 또한 고도의 해마경화를 보인 군에서조차 CA2 영역의 신경세포 소실률은 평균 31.5%을 나타내어 CA2 영역도 같이 신경세포의 소실이 동반되어 있으나 다른 영역에 비해서는 가장 신경세포의 소실이 경미한 부위인 것을 증명할 수 있었다.

이와 같이 각 영역별로 신경세포 변성 및 소실의 차이가 생기는 것은 여러 가지 인자들에 의해서 영향을 받으나 그 중에서 특히 칼슘유입과 칼슘결합단백들이 가장 중요하다.³ 현재까지 알려진 간질발작의 분자생물학적 기전의 일부는 glutamate receptor들 가운데 NMDA receptor가 칼슘에 대한 세포내 유입을 증가시킴으로써 칼슘의존형 protein kinase 등을 활성화 시켜서 *c-fos*, *c-jun*을 비롯한 즉시 조기유전자 (immediate early genes)²²⁻²⁵ 및 proenkephalin 등을 포함하는 후기 반응 유전자 (late response genes)의 발현²⁶을 초래하여 간질을 유발하는 것으로 생각하고 있다. 만약에 이 과정에서 신경세포내에 parvalbumin과 calbindin-D28K 등과 같은 칼슘결합단백이 많이 존재하는 경우에는 protein kinase의 활성화를 상대적으로 감소시켜 신경세포의 변

성 및 소실에 대하여 방어 역할을 할 수 있을 것으로 판단된다.²⁷ 해마 신경세포의 칼슘결합단백의 발현에 관한 연구⁴에서 추체세포들은 주로 calbindin-D28K의 발현을 보이고 GABA성 중간신경세포들은 parvalbumin에 대한 발현을 나타내며 발현부위는 핵주위질과 수상돌기 및 축삭에서 주로 관찰된다. 또한 암몬각 각 영역마다 불균일한 양상의 발현을 나타내며 발현 신경세포수와 강도는 CA1과 CA4영역에 비해 CA2영역에서 월등히 높은 것으로 알려져 있다. 본 연구의 결과는 대조군 및 해마경화가 없는 군에서 calbindin-D28K 발현을 보이는 신경세포들이 parvalbumin에 발현을 보이는 신경세포들보다 훨씬 많이 관찰되었는데 이는 암몬각의 대부분을 차지하는 추체세포들에서 calbindin-D28K이 주로 발현되기 때문일 것으로 사료된다. 또한 대조군 및 해마경화가 없는 군에서 calbindin-D28K 단백질 발현을 보인 CA1 및 CA4 영역의 많은 신경세포들이 해마경화가 진행될수록 많이 소실되고 이와 함께 해마경화가 진행됨에 따라 각 영역의 평균 신경세포수에 대한 calbindin-D28K 양성 신경세포의 비율도 통계학적으로 유의한 증가가 관찰되지 않았다. 이와 같은 소견은 calbindin-D28K 단백질 소량 분포하는 신경세포일수록 변성 및 소실이 잘 초래된다는 보고¹⁸와 상반되는 소견으로 과연 calbindin-D28K 단백질이 신경세포의 소실에 대한 방어작용을 가지는지 의심스러우며 앞으로 많은 연구가 뒤따라야 할 것으로 생각된다. Parvalbumin에 발현을 보이는 신경세포들은 CA2영역에서 가장 높은 빈도를 보였고 CA1과 CA4에서는 소수의 신경세포들에서만 발현이 관찰되었으며 치상회 과립세포들에서는 거의 발현을 볼 수 없었다. 이는 글루탐산성 신경세포의 과방전에 대한 억제작용을 담당하는 GABA성 중간신경세포들이 CA2영역에 가장 많이 존재하는 것으로 판단할 수가 있고 이런 작용기전이 CA2 신경세포들의 소실 및 변성을 억제시킬 것으로 추측할 수 있다. 그리고 해마경화가 경도에서 고도로 진행될수록 CA1과 CA4 영역에서 각 평균 신경세포수에 대한 parvalbumin 양성 신경세포 비율이 통계적으로 유의한 증가를 나타낸 것은 parvalbumin이 다량 분포하는 신경세포일수록 소실 및 변성에 저항함을 알 수 있었으며 calbindin-D28K 단백질보다 parvalbumin 단백질이 더욱 더 신경세포의 방어작용과 밀접한 상관관계가 있을 것으로 사료된다. 여기서 한가지 흥미로운 점은 고도 해마경화군의 CA1과 CA4 영역에서 소실되지 않고 남아있는 소수의 신경세포들이 뚜렷한 칼슘결합단백의 발현을 보인다는 것인데 이는 CA1과 CA4영역에 parvalbumin에 발현을 강하게 보이는 중간신경세포들일 가능성이 많을 것으로 사료된다.

최근에 측두엽간질의 기전에 대한 연구들 중에서 가장 획기적인 것은 Sutula등^{10,11}에 의하여 보고된 치상회 과립세포 축삭인 태상섬유의 변화에 대한 연구이다. 현재까지 알려진 바에 의하면 정상 해마조직에서 태상섬

유는 비교적 일정한 주행경로를 가지는데 우선 치상회 다형성층 (polymorphic layer)에서 섬유총 (fiber plexus)을 만들고 계속적으로 치상회 문 (hilus)에서 섬유다발 (fascicles)을 형성한 후 치상회 문과 CA3영역을 통과하여 CA2 영역까지 이르며 여기서 방향을 변환하여 암몬각의 투명층 (stratum lucidum)쪽으로 주행하게 된다.²⁸ 그러나 측두엽간질 해마조직에서는 태상섬유의 축삭발아로 인한 시냅스 재구성이 과립상부 분자층에서 흔히 관찰되어 이것이 또 하나의 측두엽간질의 기전임을 이들은 주장하였다. 일반적으로 신경세포는 분화종말 (terminal differentiation) 및 non-cycling 세포로서 알려져 있으나 만약 손상을 받게되면 각종 유전자의 발현 및 축삭발아 등과 같은 복구 과정들을 동원하여 분화상태를 지속적으로 유지하고자 한다.²⁹ 만약 간질을 유발하는 과잉방전이 해마의 치상회 과립세포에 전달되면 흥분 및 억제 균형상태가 소실되어 치상회 과립세포의 소실 및 분산을 초래하게 되고 치상회 과립세포의 복구기전으로서 태상섬유의 발아를 유발하게 되는 것으로 생각해 볼 수 있다. 해마조직에서 태상섬유의 축삭발아를 형태학적으로 관찰할 수 있는 방법은 Timm sulphide silver 조직화학기법으로서 축삭발아된 부위에 많은 존재하는 아연들을 가시화하여 관찰하는 것이다.¹¹ Timm sulphide silver 조직화학적 방법은 조직 내에서 중금속의 유무와 그 분포도 및 발현정도를 관찰할 수 있는 좋은 기법으로 1958년 Timm에 의해서 처음으로 제시되었다.¹⁶ 가령 조직 내에 납 및 아연 등과 같은 중금속이 존재하는 경우에는 sulphide silver와 반응하게 되며 이 때에 환원분자와 같이 은이온을 반응시키면 중금속이 검은 과립으로 나타나게 된다. 본 연구의 대조군에서는 치상회 과립세포 및 과립상부층의 분자층에서 Timm과립을 관찰할 수 없었으나 해마경화군에서 경화의 정도가 심할수록 과립상부층의 내분자층에 Timm 과립들이 증가하는 경향을 관찰할 수 있어 결국 태상섬유 종말의 시냅스 재구성 비율이 해마경화의 정도와 비례하는 것으로 생각되어 진다. 이러한 소견은 간질발작의 시기가 어린 나이 일수록, 발작의 횟수 및 기간이 많을수록 해마경화가 고도로 나타나는 점과 흰 쥐의 kindling 모델에서 간질을 유발하는 전기 자극의 양과 횟수가 증가됨에 따라 해마의 과립상부층의 내분자층에 Timm 과립들이 증가한다는 보고^{30,31}들과 비교해 볼 때 과립세포 태상섬유 종말의 시냅스 재구성은 일시적인 간질발작에 의한 것이 아니라 지속적인 간질발작에 의한 해마경화 및 과립세포의 손상에 따라 계속적으로 형성될 것으로 판단된다. 따라서 간질발작을 일으키는 과잉방전 자극 및 횟수에 비례하여 태상섬유의 시냅스 재구성이 증가되는 것을 의미한다고 하겠다. 또한 측두엽간질군 중에서 해마경화를 보이지 않았던 3예중에서 1예에서 치상회 과립상부층의 내분자층에 소량의 Timm 과립이 증가된 소견을 보인 것은 해마의 신경세포가 형태학적으로 소실되기 전에 태상섬유 시냅

스 재구성이 먼저 형성되는 것을 의미하지만 증례의 수가 적어 확실히 판단하기 어려우며 앞으로 이에 대한 연구가 병행되어야 할 것으로 사료된다. Timm sulphide silver 기법을 이용한 투과전자현미경적 검색에서 대조군의 해마조직 치상회 과립상부층의 내분자층에서는 Timm 과립을 관찰할 수 없었으며 측두엽간질군의 해마조직 5예 중 3예에서 치상회 과립상부층 내분자층의 시냅스 재구성 부위에 많은 Timm 과립을 관찰할 수 있어 시냅스 재구성 부위가 Timm 과립의 발현과 일치되며 시냅스 재구성 종말에 아연이 증가한다는 사실을 증명할 수 있었다.

결 론

계명대학교 동산의료원에서 최근 5년 동안 측두엽절제술에 의해 제거된 측두엽간질환자의 해마조직 50예에 대하여 암몬각의 각 영역별 신경세포 소실정도, 칼슘결합단백인 parvalbumin과 calbindin-D28K의 발현분포 및 Timm sulphide silver 조직화학기법과 본 기법을 이용한 투과전자현미경적 검색을 실시한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다. 인체의 측두엽 간질에서 흔히 관찰되는 소견인 내측두엽 경화증에서 신경세포 소실은 주로 CA1과 CA4에서 잘 발생되며 가장 저항을 보이는 영역은 CA2임을 알 수 있었다. 해마경화가 경도에서 고도로 진행될수록 CA1과 CA4 영역에서 parvalbumin 양성 신경세포의 비율이 통계적으로 유의한 증가를 나타낸 것은 parvalbumin이 다량 분포하는 신경세포일수록 소실 및 변성에 저항함을 알 수 있었으며 parvalbumin단백이 calbindin-D28K단백보다 신경세포의 방어작용에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 또한 측두엽간질군의 해마에서 치상회 과립상부층의 내분자층에 Timm과립의 존재를 확인할 수 있었고 이것이 시냅스 재구성 부위와 일치하는 것을 전자현미경적 검색으로 증명할 수 있었으며 Timm 과립들의 발현정도가 해마경화가 진행됨에 따라 비례되는 경향을 알 수가 있어 치상회 과립세포의 태상섬유 시냅스 재구성이 해마경화의 발생기전에 하나의 인자로 작용할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

1. White EL. Cortical Circuits: Synaptic Organization of the Cerebral Cortex. Boston, Birkhauser: 1989; 57-70.
2. 허균. Kindling의 임상적 응용. 대한정신약물학회지 1994; 5: 122-7.
3. 이상도, 손은익, 최병길. 간질발작기전 연구의 최근동향. 계명의대논문집 1995; 14: 148-53.
4. Leranth C, Ribak CE. Calcium-binding proteins are concentrated in the CA2 field of the monkey hippocampus: A possible key to this region's resistance to epileptic damage. Exp Brain Res 1991; 85: 129-36.

5. Award IA, Rosenfeld J, Ahl J, Hahb JF, Lders H. Intractable epilepsy and structural lesions of the brain: Mapping, resection strategies, and seizure outcome. *Epilepsia* 1991; 32: 179-86.
6. Tauck D, Nadler JV. Evidence of functional mossy fiber sprouting in hippocampal formation of kainic-acid treated rats. *J Neurosci* 1985; 5: 1016-22.
7. 김상표, 박관규, 권건영, 장은숙, 이상도, 손은익. 비중양성 병변을 보인 측두엽간질: 64예에 대한 병리학적 분석. *대한병리학회지* 1996; 30: 281-92.
8. Plate KH, Wieser HG, Yasargil MG, Wiestler OD. Neuropathological findings in 224 patients with temporal lobe epilepsy. *Acta Neuropathol* 1993; 86: 433-8.
9. Wolf HK, Campos MG, Zentner J, et al. Surgical pathology of temporal lobe epilepsy. Experience with 216 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993; 52: 499-506.
10. Sutula T, Xiao-xian H, Cavazos J, Scott G. Synaptic reorganization in the hippocampus induced by abnormal functional activity. *Science* 1988; 239: 1147-50.
11. Sutula T, Cascino G, Cavazos J, Parada I, Ramirez L. Mossy fiber synaptic reorganization in the epileptic human temporal lobe. *Ann Neurol* 1989; 26: 321-30.
12. de Lanerolle N, Kim J, Robbins R, Spencer D. Hippocampal interneuron loss and plasticity in human temporal lobe epilepsy. *Brain Res* 1989; 495: 387-95.
13. Sutula TP. Experimental models of temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 1990; 31(suppl): S45-54.
14. Babb TL, Kupfer WR, Pretorius JK, Crandall PH, Levesque MF. Synaptic reorganization by mossy fibers in human epileptic fascia dentata. *Neuroscience* 1991; 42: 351-63.
15. Haug, FMS. Light microscopical mapping of the hippocampal region, the pyriform cortex and the corticomedial amygdaloid nuclei of the rat with Timm's sulphide silver method, I. area dentata, hippocampus and subiculum. *Z Anat Entwickl Gesch* 1974; 145: 1-27.
16. Danscher G. Histochemical demonstration of heavy metals: a revised version of the silver sulphide method suitable for both light and electron microscopy. *Histochemistry* 1981; 71: 1-16.
17. Laurberg S, Zimmer J. Lesion induced sprouting of hippocampal mossy fiber collaterals to the fascia dentata in developing and adult rats. *J Comp Neurol* 1981; 200: 433-59.
18. Sloviter RS, Sollas AL, Barbaro NM, Laxer KD. Calcium-binding protein(calbindin-D28K) and parvalbumin immunocytochemistry in the normal and epileptic human hippocampus. *J Comp Neurol* 1991; 308(3): 381-96.
19. Levesque MF, Nakasato N, Vinters HV, Babb TL. Surgical treatment of limbic epilepsy associated with extra-hippocampal lesions: The problem of dual pathology. *J Neurosurg* 1991; 75: 364-70.
20. Luft JH. Improvement in epoxy resin embedding method. *J Biophysic Biochem Cytol* 1961; 9: 409-17.
21. Bruton CJ. The neuropathology of temporal lobe epilepsy. Maudsley Monographs No. 31. Oxford: Oxford University Press, 1988: 1-158.
22. Ben-Ari Y, Represa A. Brief seizure episodes induce long-term potentiation and mossy fiber sprouting in the hippocampus. *Trends Neurosci* 1990; 13: 312-8.
23. Malenka RC, Kauer JA, Perkel DJ, Nicoll RA. The impact of postsynaptic calcium on synaptic transmission: its role in long-term potentiation. *Trends Neurosci* 1989; 12: 444-50.
24. Morgan JI, Cohen DR, Hempstead JL, Curran T. Mapping patterns of c-fos expression in the CNS after seizure. *Science* 1987; 237: 192-7.
25. Shin C, McNamara JO, Morgan JI, Curran T, Cohen DR. Induction of c-fos mRNA expression by afterdischarge in the hippocampus of naive and kindled rats. *J Neurochem* 1990; 55: 1050-5.
26. Morris BJ, Feasey KJ, Buggencate GT, Hera A, Holtt V. Electrical stimulation in vivo increases the expression of proenkephalin mRNA and decreases the expression of prodynorphin mRNA in rat hippocampal granule cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988; 85: 3226-30.
27. Heizmann CW, Rohrenbeck J, Kamphuis W. Parvalbumin, molecular and functional aspects. *Adv Exp Med Biol* 1990; 269: 57-66.
28. Lim C, Blume HW, Madsen JR, Saper CB. Connections of the hippocampal formation in humans: I. The mossy fiber pathway. *J Comp Neurol* 1997; 385: 325-51.
29. Gall C, Lauterborn J, Bundman M, Murray K, Isackson P. Seizures and the regulation of neurotrophic factor and neuropeptide gene expression in brain. In: Anderson VE, Hauser WA, Leppik IE, Noebels JL, Rich SS, eds: Genetic strategies in epilepsy research. Amsterdam: Elsevier, 1991; 225-45.
30. 이상도, 이태희, 박영춘. 백서에서 pentylenetetrazol kindling에 의한 치상회 태상섬유의 시냅스 재구성. *대한신경과학회지* 1995; 13: 239-48.
31. Cavazos JE, Golarai G, Sutula T. Mossy fiber synaptic reorganization induced by kindling: Time course of development, progression, and permanence. *J Neurosci* 1991; 11: 2795-803.